Arnaldoa 15(2): 217 - 226,
2008

ISSN: 1815-8242

Genotoxicidad del dicromato de potasio en meristemos radiculares y meiocitos de *Vicia faba*

Genotoxicity of potassium dichromate in root apical meristems and meiocytes of *Vicia faba*

Zulita Prieto, Radigud Fernández , Julio León-Incio, Carlos Quijano-Jara, Roger Vallejo-Rodríguez

Laboratorio de Genética, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, PERÚ. *zapl99@yahoo.com*

Resumen

Se determinó las frecuencias de alteraciones cromosómicas en meristemos radiculares y en meiocitos de anteras de *Vicia faba* expuestos a dicromato de potasio. Para el estudio mitótico, las raíces secundarias fueron tratadas con dicromato de potasio 0.5mg/ml durante 8h y 40h de recuperación en agua potable declorinada. Para la evaluación de meiocitos, se sembraron semillas en macetas con tierra fértil y al inicio de la floración se agregaron al sustrato 50mL de dicromato de potasio 0.5mg/mL. Se registró disminución de la actividad mitótica por efecto del dicromato de potasio, con incremento significativo de las frecuencias de células con puentes cromosómicos, cromosomas rezagados y micronúcleos. En meiosis, se reporta alteraciones en la segregación cromosómica I y II, micronúcleos, minicélulas. Alteraciones en la cariocinesis y citocinesis fueron evidentes tanto en mitosis como en meiosis.

Palabras clave: *Vicia faba*, genotoxicidad, dicromato de potasio, meiosis, micronúcleo, alteraciones cromosómicas.

Abastract

The frequency of chromosomal abnormalities was determined on root apical meristems and meiocytes of *Vicia faba* anthers exposed to potassium dichromate. To the mitotic study, secondary roots were treated with potassium dichromate at 0.5mg/ml during 8h and recovery in dechlorinated tap water during 40h. To carry out the meiocytes evaluation, seeds were sown in pots with fertile land and at the beginning of flowering, 50mL of potassium dichromate at 0.5mg/mL were added to the substrate. We found a reduction in the mitotic activity by the effect of potassium dichromate, with significative increase in the frequencies of chromosomal bridges, lagging chromosomes, micronuclei and regarding meiosis evaluation, alterations in chromosome segregation I and II, micronuclei, mini-cells. Alterations in the karyokinesis and cytokinesis were evident in both mitosis and meiosis

Keywords: *Vicia faba*, genotoxicity, potassium dichromate, meiosis, micronuclei, chromosomal abnormalities.

Introducción

Evidencias epidemiológicas sobre la carcinogenicidad de los cromatos en trabajadores vinculados a actividades industriales (Bidstrup, 1951; Doll, 1978; Langard & Vigander, 1983) y en otros organismos expuestos (Léonard & Lauwerys, 1980; Levy et al., 1986; De Flora et al., 1990), han contribuido para catalogar al cromo en su estado hexavalente Cr(VI), dentro del grupo I de los carcinógenos humanos por la *Internacional Agency for Research on Cancer*, 1990.

El Cr(VI) en las formas aniónicas CrO_4^{2-} , $HCrO_4^-$ o Cr_2O_7 tiene la capacidad de ingresar a la célula por la vía general de los canales proteicos transportadores de aniones (Fornace et al., 1981; Gómez & Callao,2006), en el espacio intracelular es reducido a la forma pentavalente Cr(V), y luego a los estados Cr(IV) y Cr(III) (Arslan et al., 1987; Borthiry et al., 2007), formando complejos con ligandos de aminoácidos, proteínas, RNA y DNA (Petrilli & De Flora, 1988; O´Brien et al., 2003). La interacción del Cr(V), principalmente del Cr(III) con el DNA conducen a la formación de aductos que alteran los procesos de replicación, transcripción (Singh et al., 1998; Wei et al., 2004), producen roturas de cadenas simples del DNA (SSB) (Ueno et al., 2001) y cadenas dobles (DSBs) (Xie et

al., 2005), entre otras alteraciones. Así mismo, la oxidación de reductantes da lugar a la generación masiva de especies de radicales reactivos (ROS), con alta capacidad de alterar la constitución química de proteínas, lípidos y DNA (Bagchi et al., 1995; Levina & Lay, 2005). Los mecanismos moleculares que subyacen a los efectos citológicos, mutagénicos y carcinógenos del complejo Cr(VI) no son totalmente conocidos, en particular a su complicada química intracelular, múltiples blancos y vías metabólicas involucradas.

En relación a la actividad genotóxica de los cromatos particulados y solubles, se reportó que el daño genético es más persistente con el cromato de plomo (particulado) comparado a los efectos del cromato de sodio (soluble), con este último, en células de fibroblastos bronquiales los efectos del Cr(VI) decae a las 72h luego de la primera dosis (Colmes et al., 2006). Se reportaron espectros similares de daño cromosómico en células de epitelio bronquial expuestas a compuestos particulados y solubles (Wise et al., 2006). Estudios con dicromato de potasio, el más soluble de los cromatos, demuestran su genotóxicidad en los sistemas genéticos que se probaron: mutaciones en bacterias, alteraciones cromosómicas en líneas célulares, micronúcleos en ratones (Citados en Léonard & Lauwerys, 1980), alteraciones cromosómicas durante la división mitótica en *Vicia faba* (Qian, 2004), mutaciones en levadura (Kharab & Singh, 1985), micronúcleos en *Procambarus clarkii* (Sienra et al., 2003), correlación de bandas polimórficas (*amplified fragment length polymorphism*, AFLP) y la concentración de dicromato de potasio en *Pseudokirchneriella subcapitata* (Labra et al., 2007), roturas cromosómicas en ratones (Devi et al.,2001; Wang et al., 2006). En todos ellos (eucariotas), se evaluaron en células somáticas.

A nivel de células germinales, se determinó la reducción del volumen y movilidad de espermatozoides de humanos en centros laborales con emisiones de Cr(VI), disminución del número de células germinales en el epidídimo e incremento de niveles de anormalidad espermática por efecto de ácido crómico en ratas (Li et al., 2001), alteraciones cromosómicas en los meiocitos, espermátides multinucleadas, cambios histopatológicos en testículos de *Macaca radiata* expuestos a dicromato de potasio (Aruldhas et al, 2005; Subramanian et al., 2006), incremento de los niveles de peroxidación lipídica y espermatozoides anormales en ratones inducidas por ácido crómico (Acharya et al., 2006), además de estas últimas alteraciones, se registraron cambios degenerativos en los ciclos espermatogénicos, niveles incrementados de Δ^5ß-hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD) en ratones tratados con dicromato de potasio (Chandra et al., 2007). No obstante, estudios de genotoxicidad a nivel meiótico siguen siendo escasos.

En las células somáticas, interfase-S es la fase celular con mayor probabilidad de ocurrencia de lesiones en el DNA y en las células germinales, además de la fase-S, profase I constituye una fase que incrementa la probabilidad de alteraciones genéticas. La dinámica en la estructuración cromosómica en los procesos de sinapsis e intercambio genético «*crossing over*» (Moens 1969; Sherthan, 2001) pueden ser escenarios de intercambios cromosómicos inusuales (Fernández-Donoso, 1982; Bandyopadhyay et al., 2002) aún más, con la presencia de genotóxicos en el medio (Nijhoff & De Boer, 1980). Los reordenamientos cromosómicos alterados de constituirse en los gametos, afectarían la fertilidad de los individuos y con posibilidad de transmisión de alteraciones genéticas a futuras generaciones. Por lo que, la evaluación de los efectos genotóxicos en el proceso meiótico es importante.

Vicia faba constituye un sistema genético que permite la cuantificación de aberraciones cromosómicas durante las divisiones mitóticas y meióticas. Con la finalidad de aportar nuevas evidencias de los efectos genotóxicos del dicromato de potasio en células somáticas y germinales se consideró *Vicia faba* como sistema genético. Se registraron alteraciones cromosómicas en meristemos radiculares y en meiocitos de anteras de *Vicia faba* expuesto a dicromato de potasio.

Materiales y Métodos

1) Células somáticas: meristemos de raíces secundarias de *Vicia faba*.

Diseño experimental: Semillas sanas y de tamaños similares se colocaron en sustratos de algodón para su germinación hasta la emergencia de raíces secundarias. Las semillas con raíces secundarias en crecimiento, de 1 a 2 cm, fueron expuestas de manera individual a concentraciones de 0.0 y 0.5mg/ml de dicromato de potasio durante 8 horas, luego de la toma de muestra (2 a 3 raíces), las raíces restantes de cada semilla se enjuagaron en agua y se dejaron que continúen su crecimiento sin dicromato de potasio (fase de recuperación). Después de 40 horas de recuperación se procedió con la segunda toma de muestra (2 a 3 raíces). Las muestras apicales de cada semilla fueron fijadas en Carnoy's y coloreadas con orceína acética 1% durante 30 minutos. Obteniéndose un extendido celular por meristemo apical, 4 a 6 raíces por semilla y tres semillas por tratamiento.

Toma de datos: Las células fueron observadas a 1000X de magnificación y la cuantificación se realizó de dos maneras, 1) Conteo al azar de 2000 células a las 8h de tratamiento y a las 40h de recuperación, en las que se identificó células en interfase y fases mitóticas con y sin alteraciones. Se estimaron los índices de mitosis (IM), profases (IP), metafases (IM), anafases (IA) y telofases (IT), 2) Conteo de células en anafase y telofase (AT) con y sin puentes cromosómicos, aproximadamente en todo el extendido celular de cada raíz a las 8h de tratamiento. Se obtuvieron las frecuencias de anafase-telofases con puentes cromosómicos (ATp), de la siguiente manera:

%ATp= ATp/Total de células en anafase y telofase.

Se utilizaron como criterios para la identificación de micronúcleos, estructura redondeada, diámetro significativamente inferior al núcleo principal, con coloración similar y clara separación del núcleo principal (Albertini et al., 2000) y, para el registro de células con puentes cromosómicos se consideró células en anafase y telofase con conexiones cromosómicas claramente visibles.

Procesamiento estadístico: se estimaron las frecuencias de fases: índice mitótico, índices de fases celulares con y sin alteraciones. La determinación de diferencias entre tratamientos se realizó con la prueba «t de student» y en aquellos datos que no se ajustaron a la distribución normal se procesó con la prueba de Mann-Whitney. La variación de frecuencias de anafases y telofases con puentes cromosómicos y células con micronúcleos dentro de cada tratamiento se determinó con el análisis de varianza encajado ($p<0.05$).

2) Células germinales: meiocitos y microsporas en anteras de *Vicia faba*.

Diseño experimental:

Se prepararon 6 recipientes de 20 x 25 cm de diámetro con tierra fértil y se sembraron 5 semillas de *Vicia faba* en cada uno. Todos los maceteros se mantuvieron en iguales condiciones de luz, temperatura y humedad, necesarios para su germinación y desarrollo. En la etapa de inicio de la floración se agregó al sustrato de cada macetero 50 ml de dicromato de potasio a concentración de 0.0 y 0.5mg/ml. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

Toma de muestra:

Después de 20 días tratamiento se procedió con la selección de primordios florales por tamaños y se determinó el tamaño probable para la observación de fases meióticas. Se obtuvieron anteras y se colorearon por 10 minutos con orceína acética al 1% acidulada con HCL 1 N. La identificación y conteo de células meióticas se realizó en la población celular de cada flor a 1000X.

Resultados

A nivel mitótico:

En los meristemos radiculares de *Vicia faba* expuestas a dicromato de potasio a 0.5mg/ml durante 8h, el índice mitótico promedio fue de 1.93±0.06%, significativamente menor ($p<0.05$) a 7.88±2.37% del control. Después de 40h de recuperación, contrariamente a los resultados anteriores, el índice profásico y el índice mitótico estuvo incrementado en el tratamiento con dicromato de potasio, cuyos valores promedios fueron: 8,27 ±1.32% y 13.11±1,81% y del control, 4.44±2.18% y 8.01±3.27%, respectivamente ($p<0.05$) (Tabla 1).

En relación al daño cromosómico, a las 8h de exposición directa al dicromato de potasio se observó

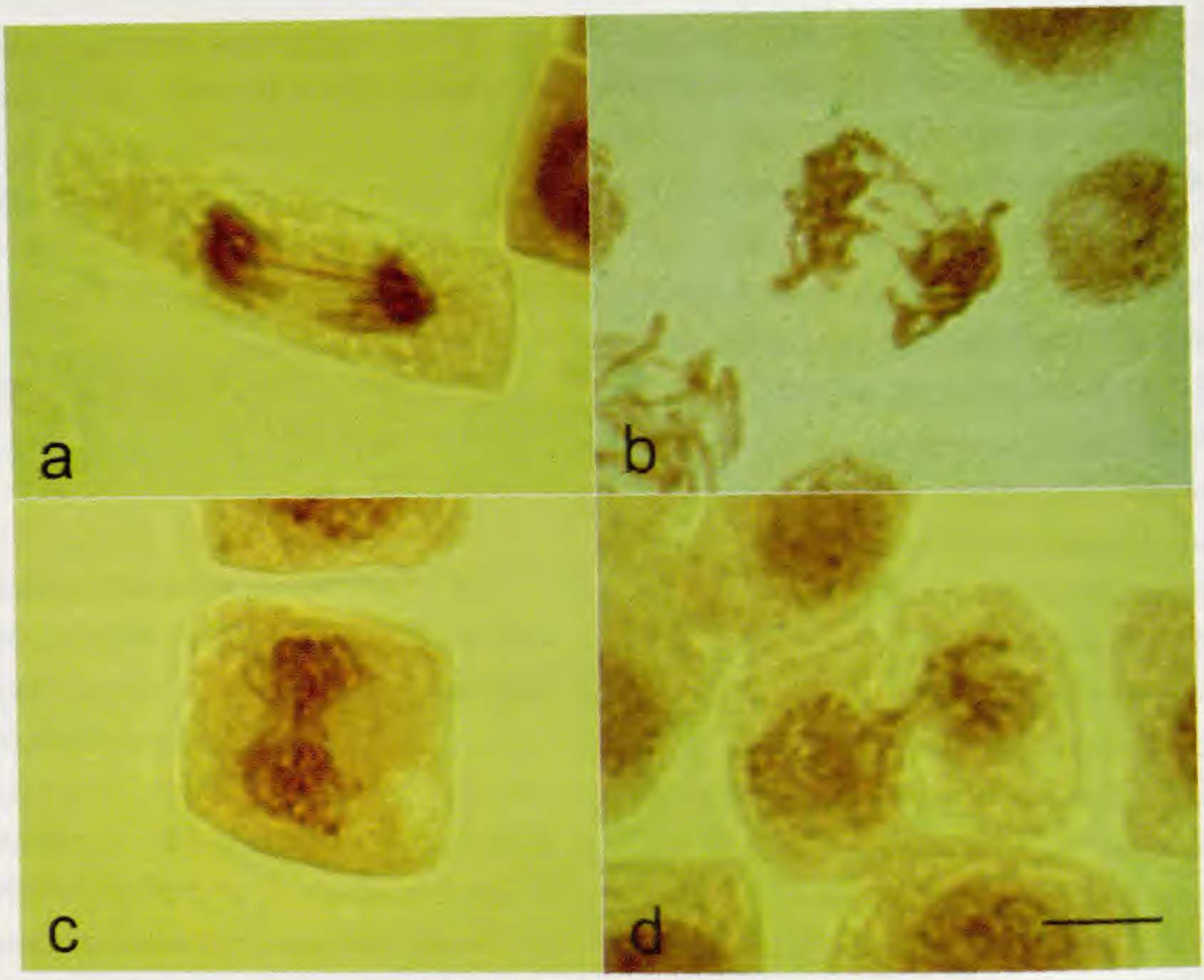

Fig.1. Telofases con puentes cromosómicos (ATp) en meristemos radiculares de *Vicia faba* expuestos a dicromato de potasio 0.5mg/ml. **a.** un puente; **b** y **c**; puentes múltiples, **d**; citocinesis con puentes cromosómicos. Barra 10µm.

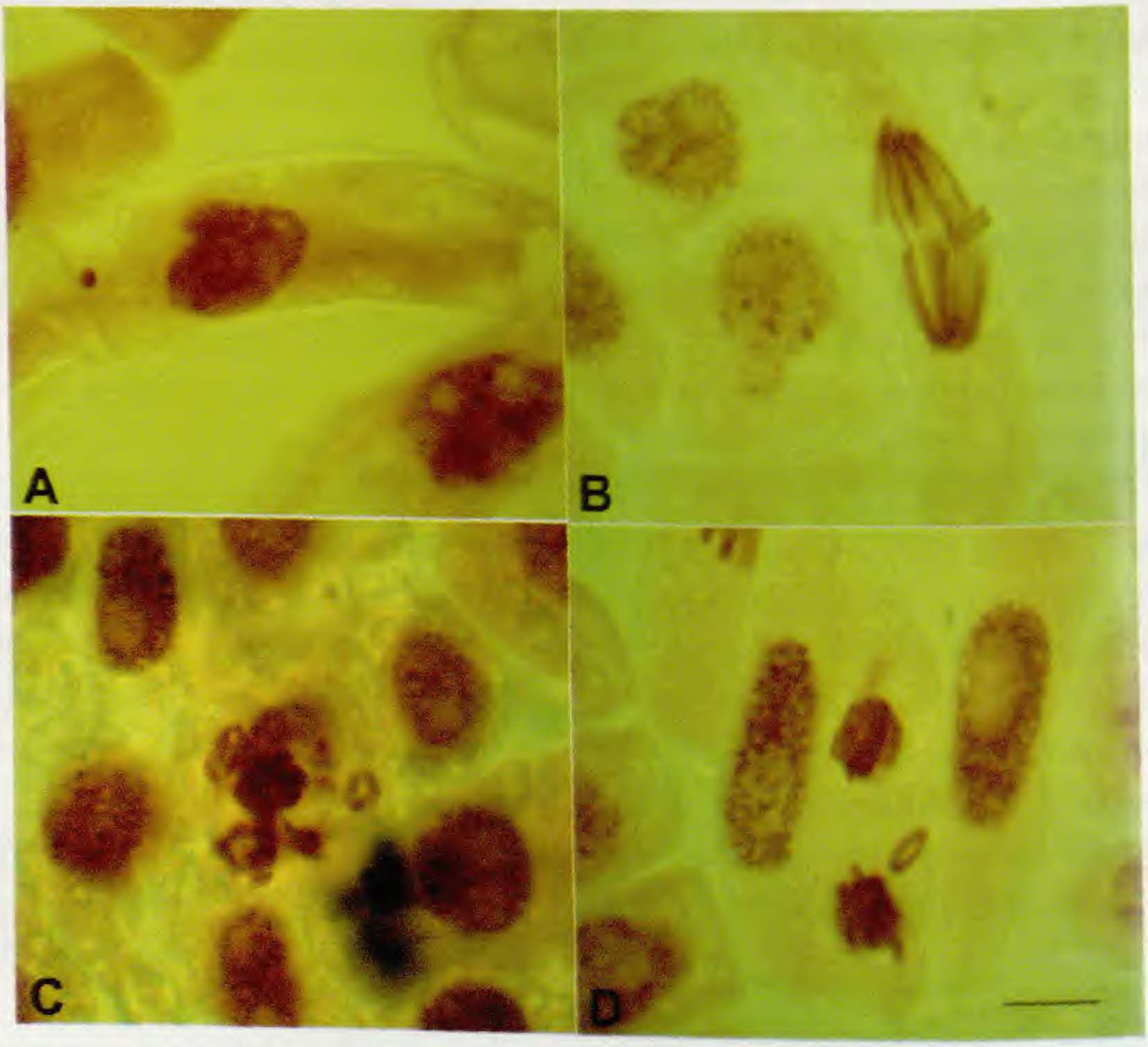

Fig. 2. Alteraciones cromosómicas en meristemos radiculares de *Vicia faba* expuestos a dicromato de potasio 0.5mg/ml. **A.** célula con núcleo lobulado y portador de MN.; **B.** brote nuclear; **C.** metafase alterada, cromosoma en anillo; **D.** cromosoma rezagado. Barra 10µm.

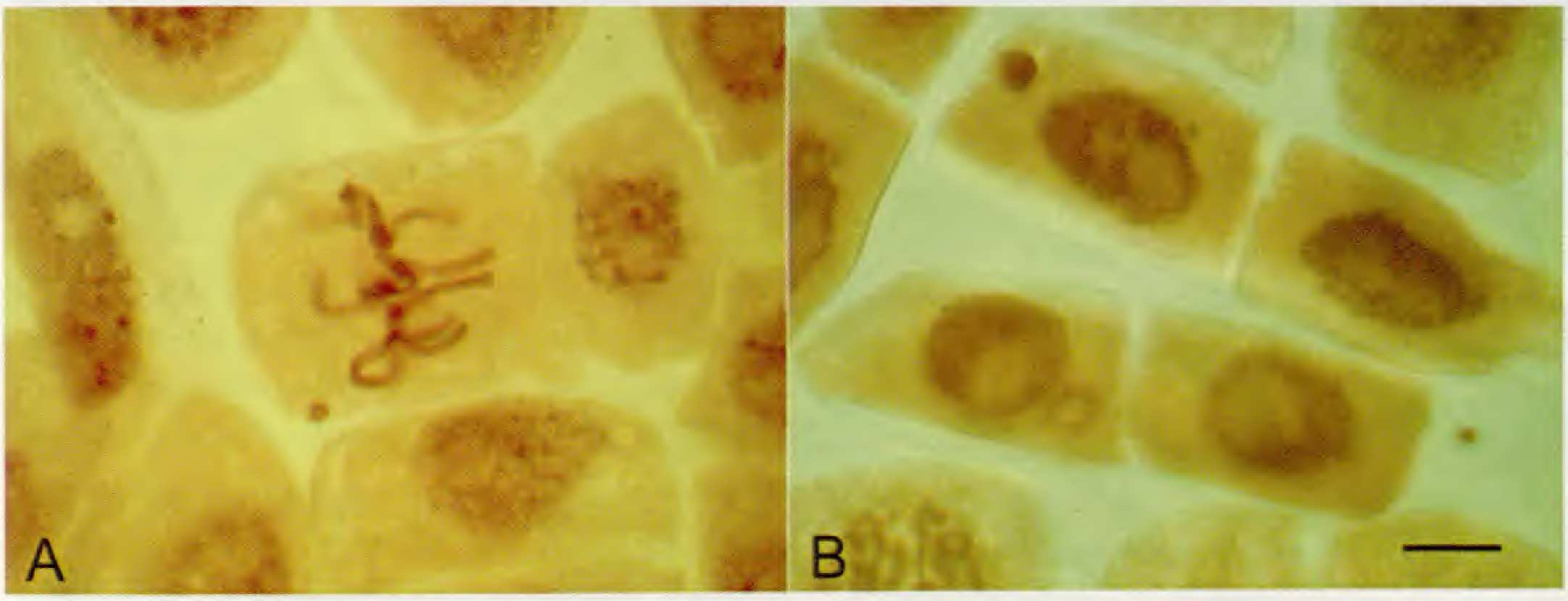

Fig. 3. Micronúcleos (MN) en meristemos radiculares de *Vicia faba* expuestos a dicromato de potasio 0.5mg/ml. **A.** metafase con MN pequeño; **B.** interfases con MN que difieren en la compactación de MN. Barra 10µm.

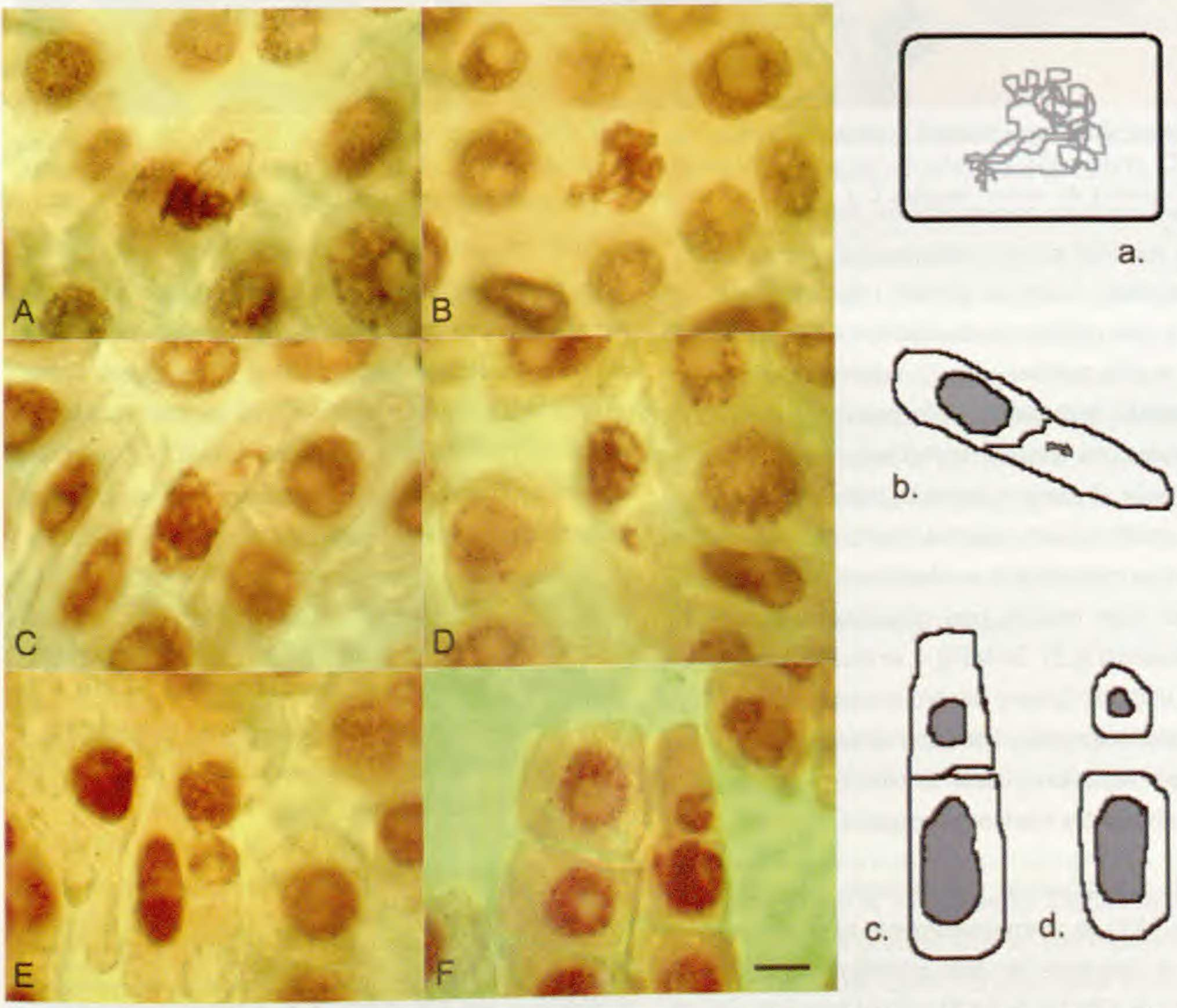

Fig. 4. Alteraciones en la segregación cromosómica en meristemos radiculares de *Vicia faba* expuestos a dicromato de potasio 0.5mg/ml. **A** y **B**. migración alterada y falta de condenzación cromosómica; **C** y **D**. cromosoma segregado e inicio de citocinesis; **E** y **D**. citocinesis con variación del tamaño de núcleos. Barra 10µm. **a.** Migración de un grupo reducido de cromosomas; **b** y **c.** Citocinesis con diferencias en el tamaño de los núcleos segregados; **d.** Células hijas, minicélula y célula con mayor contenido nuclear.

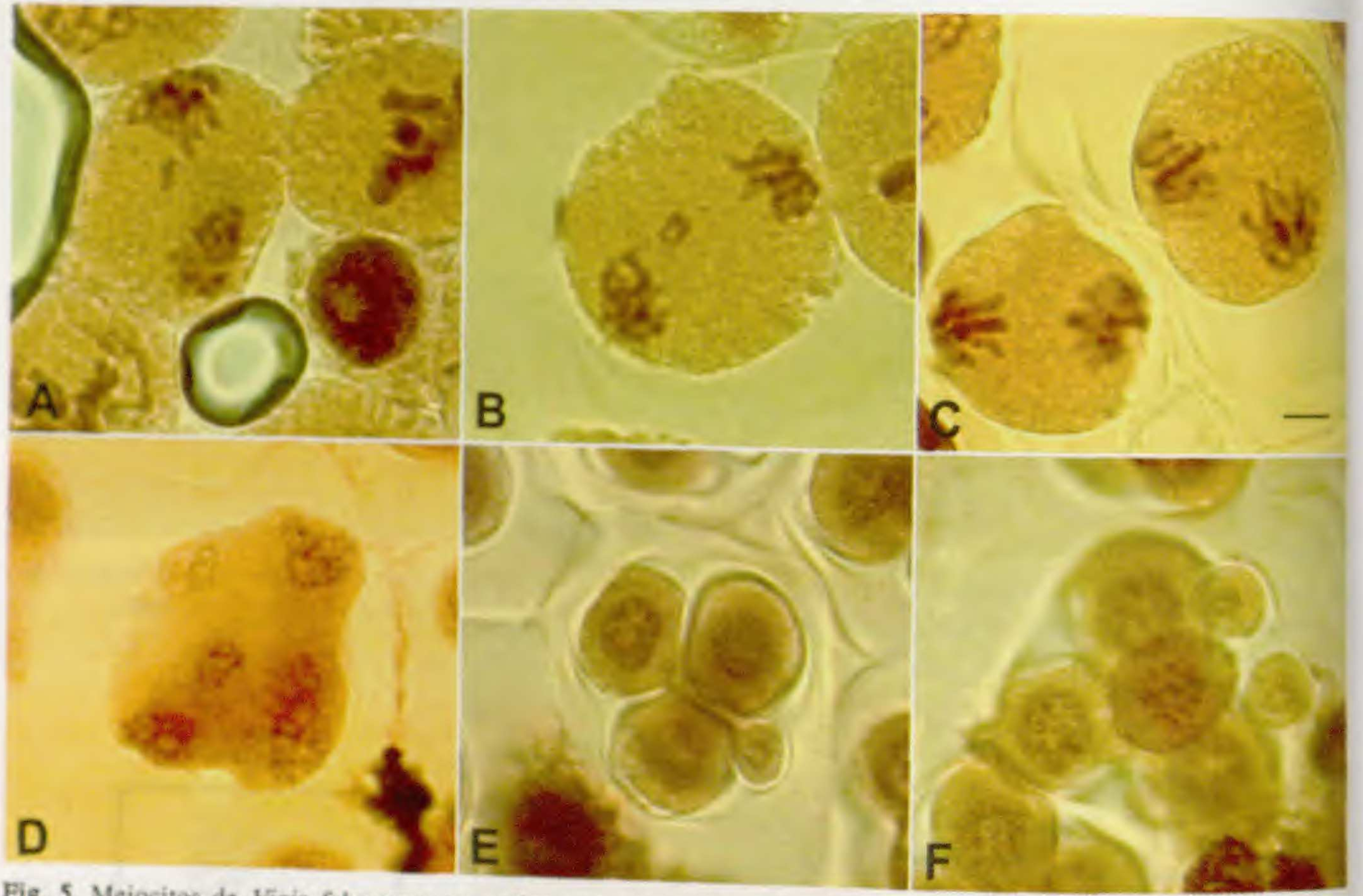

Fig. 5. Meiocitos de *Vicia faba* expuesta a dicromato de potasio 0.5mg/ml. **A** y **B**. cromosomas rezagados en anafase I; **C**. orientación alterada de los grupos cromosómicos en telofase I; **D**. telofase II portador de dos núcleos adicionales de menor tamaño; **E** y **F**. tetradas con una y dos minicélulas adicionales. Barra 10µm.

alteraciones durante la división mitótica, tales como: telofases con puentes cromosómicos (ATp), variando de uno a más puentes (Fig.1), anafase-telofases con cromosomas rezagados, deformaciones nucleares, cromosoma en anillo, metafases con ubicación desordenada al plano ecuatorial, micronúcleos, brote nuclear «*buds nuclear*», descondenzación de la cromatina (Fig.2). Los micronúcleos se observaron en las diferentes fases del ciclo celular, con variación de tamaños y compactación (Fig.3). En la Fig. 4, se muestra la migración de un reducido grupo de cromosomas a un polo; cromosoma segregado, conexión cromatínica entre los dos grupos separados, inicio de citocinesis y variación de tamaños de los núcleos segregados.

De la cuantificación, considerando solo anafases y telofases (AT) en aproximadamente todo el extendido celular en muestras de cada meristemo radicular, la frecuencia de ATp fue de 34.39 ± 20.64 %de ATp a las 8h de exposición al dicromato de potasio, valores significativos con respecto al control (Tabla 2). Sin embargo, cuando se evaluó ATp aleatoriamente, se registró 0.05±0.07% de 2095 células en promedio, valor no significativo comparado con el control. Después de 40h de recuperación, se cuantificó micronúcleos (MN), ATp y ATrz en muestras elegidas al azar de todo el extendido celular y se encontró 1.98±0.88% de MN ($p<0.05$), las demás alteraciones no presentaron diferencias significativas ($p>0.05$).

Se observó variación en las frecuencias de alteraciones cromosómicas entre semillas por efecto del dicromato y una relación entre la magnitud de ATp a las 8h con la magnitud de MN a las 40h de recuperación, a mayor porcentaje de ATp a las 8h menor porcentaje de MN a las 40h de recuperación.

***A nivel meiótico*:**

Por efecto del dicromato de potasio se observaron alteraciones en las diferentes fases meióticas. Micronúcleos en células madres de polen, cromosomas rezagados en anafase I y telofase I, alteración en la orientación segregacional de los cromosomas en anafase I, comparada con una célula normal, telofase II con más de cuatro núcleos

y presencia de uno y dos minicélulas adicionales a las cuatro microsporas (Fig. 5). Tales alteraciones no fueron registradas en los meiocitos del control.

Discusión

La reducción del índice mitótico en meristemos de raíces en *Vicia faba* revela el efecto citotóxico del dicromato de potasio a las 8h de tratamiento. Condiciones tóxicas generadas por el Cr(VI) del dicromato de potasio habrían alterado la actividad proliferativa, principalmente en interface. Uno de los mecanismos que explican la acción del Cr(VI) en la inhibición del ciclo celular en la fase G1 es por activación de la proteína p21 (Mattia et al, 2007; Hill et al, 2008) y de otros genes implicados con la regulación del ciclo celular y/o apoptosis, como consecuencia del incremento de la proteína p53 inducida por los radicales ·OH generados de la reacción de Fenton - H_2O_2 + Cr(V)- (Wang, 2000).

Respecto a los índices de fases del proceso mitótico después de 40h de recuperación, el aumento significativo del índice profásico, sería indicador del desbloqueo celular en interfase. Por la ausencia de dicromato de potasio en el medio de crecimiento radicular después de 8h de tratamiento, el nivel del Cr(VI) intracelular disminuiría produciendo la desactivación de genes como la p21, la activación de genes inhibidos, que habrían producido el detenimiento del ciclo celular en interfase. El incremento de profases, podría explicarse también por la alteración de la expresión de genes que controlan el paso de G2 a mitosis. Los reportes del efecto del Cr(VI) sostienen que el evento primario en la disrupción de la expresión génica es la formación del complejo nuclear Cr(III)-DNA en las regiones promotoras produciendo represión transcripcional (Schnekenburger et al., 2007).

La relación inversamente proporcional entre la magnitud de ATp a las 8h con la frecuencia de MN a las 40 h de recuperación, explicaría la mayor capacidad de recuperación que tendrían las células con menos lesiones en el DNA, y que escapan del proceso apoptósico en ventaja de aquellas, que por la presencia de uno o más puentes cromosómicos probablemente tomarían la vía apoptósica o tardarían más en continuar el proceso proliferativo.

Las diferencias registradas en respuesta al Cr(VI) en las poblaciones celulares existentes en cada meristemo radicular entre semillas y dentro de cada semilla, expuestas a una misma concentración de dicromato de potasio, serían indicadores de que, no todo el DNA celular está igualmente expuesto, dependerá en gran medida de su estado funcional y de los efectos aleatorios que produciría el Cr(VI) en el DNA expuesto, existiendo mayor probabilidad de daño genético en las secuencias de DNA con elevada actividad de replicación y transcripción. Estudios en cultivos celulares de fibroblastos encontraron diferencias en el fenotipo celular y en los patrones de expresión de genes dentro de la misma población celular expuestas al Cr(VI) del Na_2CrO_4, aislaron células susceptibles y resistentes al Cr(VI), éstas últimas, mostraron resistencia a la apoptosis, potencial de crecimiento incrementado y expresión de genes alterados a diferencia de las células susceptibles al Cr(VI) (Pritchard et al., 2005).

La variación en el tamaño y grado de compactación de los micronúcleos, se debería al tipo de cromatina existente en ellos, en MN menos condensados existiría eucromatina y hetecromatina y en los MN más pequeños y de mayor compactación, principalmente heterocromatina. Observaciones ultraestructurales en embriones de *Triticum aestivum* y *Pennisetum glaucum* revelaron una correlación positiva entre el tamaño de MN y la proporción de eucromatina y heterocromatina, MN grandes contienen mayor proporción de eucromatina (Gernand et al., 2005). Probablemente, MN grandes son consecuencia de efectos aneugénicos, asociados al tamaño del cromosoma rezagado.

Las células en anafase-telofase con puentes múltiples se habrían originado por alteraciones en la compactación cromosómica, los cromosomas descondensados «pegajosos» se mantendrían unidos durante la segregación cromosómica, pudiendo segmentarse con la formación del fragmoblasto, el daño sobre el material genético sería tal que la probabilidad de recuperación de estas células sería escasa. Los mecanismos que explican la alteración en la condensación cromosómica por efecto del cromo no se conocen. Wei et al., 2004; Schnekenburger et al., 2007, reportan cambios

conformaciones a nivel de nucleosomas por efecto del Cr(III) que impiden el inicio de la transcripción.

Por otro lado, la cariocinesis asimétrica mostrada por efecto del Cr(VI) derivado del dicromato de potasio tanto en células somáticas como en células meióticas, serían indicadores de alteraciones en el complejo de proteínas implicados en los procesos de condensación cromosómica, lo cual ocurre, paralelo a la formación de la banda pre-profásica, importante para la ubicación sincrónica del conjunto de cinetocoros al huso acromático y segregación cromosómica equitativa. De acuerdo a las configuraciones adoptadas en la segregación cromosómica por efecto del Cr(VI) en los meristemos de raíz de *Vicia faba,* se propone una explicación de la presencia de minicélulas, como consecuencia de la segregación incompleta y no equitativa del conjunto de cromosomas, falta de condensación cromosómica, asincronía en el progreso acromático y compactación cromosómica, se genera la citocinesis con una fisión obligada de los cromosomas o con la segregación de uno o mas cromosomas, resultando dos células hijas con núcleos notoriamente distintas, una minicélula y otra, con un exceso de material genético. En la figura 4, A. Inicio de la migración de un grupo reducido de cromosomas, B y C. citocinesis con variación del contenido nuclear, y minicélula en la figura D. Un mecanismo alternativo, al origen de un microcito.

Además, fueron evidentes alteraciones en la ubicación de cromosomas en el plano ecuatorial en metafase, micronúcleos en diferentes estadíos del ciclo celular, roturas, cromosomas anulares, cromosomas rezagados durante la migración cromosómica, «nuclear buds». Alteraciones similares fueron registradas en raíces apicales de *Vicia faba* utilizando CrO_3 y dicromato de potasio (Qian, 2004).

A nivel meiótico, se observó cromosomas rezagados durante la segregación cromosómica en la primera y segunda división, cariocinesis no equitativa, presencia de minicélulas a nivel de microesporas y micronúcleos en meiocitos en profase temprana y a nivel de tetradas de *Vicia faba*. En consecuencia a las alteraciones en los meiocitos por efecto del Cr(VI), la viabilidad de los gametos de los individuos expuestos estaría disminuida, con probabilidad de generar individuos aneuploides o portadores de translocaciones, inversiones, deleciones y/o mutaciones. .

De todas las alteraciones registradas durante la mitosis por efecto del dicromato de potasio en *Vicia faba*, a las 8 horas de tratamiento, las células AT con puentes cromosómicos del total de telofases fueron significativamente altas comparada a los ATp evaluadas al azar y a las 40 horas de recuperación después de la exposición al dicromato de potasio, la alteración mas frecuente fue la presencia de MN. Consideramos estos dos parámetros altamente sensibles para ensayos de genotoxicidad. Este método de evaluación tiene ventajas de ser factible de que la cuantificación sea realizada por más de un observador, mayor objetividad, disminución del error de muestreo, facilidad en la toma de datos y resultados comparables en diferentes laboratorios.

La presencia de múltiples alteraciones cromosómicas registradas tanto a nivel de mitosis como en meiosis en *Vicia faba* demuestra el alto potencial cito-genotóxico del dicromato de potasio.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Lilibeth Cisneros Gonzales, alumna de la Facultad de Ciencias Biológicas, por su colaboración en la ejecución del diseño experimental del trabajo.

Literatura citada

Acharya UR, Mishra M, Tripathy RR, Mishra I. 2006. Testicular dysfunction and antioxidative defense system of Swiss mice after chromic acid exposure.Reprod Toxicol. 22:87-91.

Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, et al. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. Mutat Res. 463:111–72.

Arslan P, Beltrame M, Tomasi A. 1987. Intracellular chromium reduction. Biochim Biophys Acta 931(1):10-5.

Aruldhas MM, Subramanian S, Sekar P, Vengatesh G, Chandrahasan G, Govindarajulu P, et al. 2005. Chronic chromium exposure-induced changes in testicular histoarchitecture are associated with oxidative stress: study in a non-human primate (*Macaca radiata* Geoffroy). Hum Reprod. 20:2801-13.

Bagchi D, Hassoun EA, Bagchi M, Muldoon DF, Stohs SJ. 1995. Oxidative stress induced by chronic administration of sodium dichromate [Cr(VI)] to rats. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol. 110(3):281-7.

Bandyopadhyay R, Heller A, Knox-DuBois C, McCaskill Ch, Berend SA, Page SL, Shaffer LG. 2002. Parental Origin and Timing of De Novo Robertsonian Translocation Formation Am J Hum Genet. 71(6):1456-62.

Bidstrup P L. 1951. Carcinoma Of The Lung In Chromate Workers. Brit J Industr Med. 8(4):302–5.

Borthiry GR , Antholine WE, Kalyanaraman B, Myers JM, Myers CR. 2007. Reduction of hexavalent chromium by human cytochrome b5: Generation of hydroxyl radical and superoxide. Free Radic Biol Med. 42:738–55

Chandra AK, Chatterjee A, Ghosh R, Sarkar M, Chaube SK. 2007. Chromium induced testicular impairment in relation to adrenocortical activities in adult albino rats Reprod Toxicol. 24:388–96.

De Flora S, Bagnasco M, Serra D, Zanacchi P. 1990. Genotoxicity of chromium compounds. A review. Mutat Res. 238(2):99-172.

Devi KD, Rozati R, Saleha Banu B, Jamil K, Grover P. 2001. In vivo genotoxic effect of potassium dichromate in mice leukocytes using comet assay. Food Chem Toxicol. 39(8):859-865.

Doll R. 1959. Occupational Lung Cancer: A Review Brit J Industr Med.; 16(3): 181–90.

Fernández-Donoso R. 1982. Asociaciones cromosómicas en el núcleo de los meiocitos y reordenamientos cromosómicos. Actas V Congr. Latinoam. Genética. 105-14.

Fornace AJ Jr, Seres DS, Lechner JF, Harris CC. 1981. DNA-protein cross-linking by chromium salts. Chem Biol Interact. 36(3):345-54.

Gernand D, Rutten T, Varshney A, Rubtsova M, Prodanovic S, Brü C, et al. 2005. Uniparental Chromosome Elimination at Mitosis and Interphase in Wheat and Pearl Millet Crosses Involves Micronucleus Formation, Progressive Heterochromatinization, and DNA Fragmentation. The Plant Cell. 17:2431–8.

Gómez V, Callao MP. 2006. Chromium determination and speciation since 2000. TrAC. 25 (10):1006-15.

Hill R, Leidal AM, Madureira PA, Gillis LD, Cochrane HK, Waisman DM, et al. 2008. Hypersensitivity to chromium-induced DNA damage correlates with constitutive deregulation of upstream p53 kinases in p21-/- HCT116 colon cancer cells. DNA Repair. 7(2):239-52.

Holmes AL, Wise SS, Sandwick SJ, Wise JP Sr. 2006. The clastogenic effects of chronic exposure to particulate and soluble Cr(VI) in human lung cells. Mutat Res. 610(1-2):8-13

International Agency for Research on Cancer. IARC 1990. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Chromium, nickel and welding. Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

Kharab P, Singh I. 1985. Genotoxic effects of potassium dichromate, sodium arsenite, cobalt chloride and lead nitrate in diploid yeast Mutat Res. 155:117-20.

Labra M, Bernasconi M, Grassi F, De Mattia F, Sgorbati S, Airoldi R, et al. 2007. Toxic and genotoxic effects of potassium dichromate in *Pseudokirchneriella subcapitata* detected by microscopy and AFLP marker analysis. Aquat Bot. 86(3):229-35.

Langard S, Vigander T. 1983. Occurrence Of Lung Cancer In Workers Producing. Chromium Pigments. Br J Ind Med. 40(1): 71–4.

Léonard A, Lauwerys RR. 1980. Carcinogenicity And Mutagenicity Of Chromium. Mutat Res. 76(3):227-39.

Levina A, Lay PA. 2005. Mechanistic studies of relevance to the biological activities of chromium. Coordination Chemistry Reviews. 249:281-98.

Levy L S, Martin P A, Bidstrup P L. 1986. Investigation Of The Potential Carcinogenicity Of A Range Of Chromium Containing Materials On Rat Lung. Br J Ind Med. 43:243-56.

Li H, Chen Q, Li S, Yao W, Li L, Shi X, Wang L, Castranova V, Vallyathan V, Ernst E, Chen C. 2001. Effect of Cr(VI) Exposure on Sperm Quality: Human and Animal Studies. Ann. occup. Hyg. 45(7):505-11.

Mattia M, Gottifredi V, McKinney K, Prives C. 2007. p53-Dependent p21 mRNA Elongation Is Impaired when DNA Replication Is Stalled. Mol Cell Biol. 27(4):1309–20.

Moens PB. 1969. The fine Structure of Meiotic Chromosome Polarization and Pairing in *Locusta migratoria* Spermatocytes. Chromosoma. 28(1):1-25.

Nijhoff JH, de Boer P. 1980. Radiation-induced meiotic autosomal non-disjunction in male mice The effects of low doses of fission neutrons and X-rays in meiosis I and II of a Robertsonian translocation heterozygote. Mutat Res. 72(3):431-46.

O'Brien TJ, Ceryak S, Patierno SR. 2003. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. Mutat Res. 533(1-2):3-36.

Petrilli FL, De Flora S. 1988. Metabolic reduction of chromium as a threshold mechanism limiting its in vivo activity. Sci. Total Environ 71(3):357-64.

Pritchard DE, Ceryak S, Ramsey KE, O'Brien TJ, Ha L, Fornsaglio JL, Stephan DA, Patierno SR. 2005. Resistance to apoptosis, increased growth potential, and altered gene expression in cells that survived genotoxic hexavalent chromium [Cr(VI)] exposure. Mol Cell Biochem. 279(1-2):169-81.

Qian XW. 2004. Study on teratogenic effect of potassium dichromate on *Vicia faba* root tip cells. Yi Chuan. 26(3):337-42

Scherthan H. 2001. A bouquet makes ends meet. Nature Rev.Mol Cell Biol. 2:621-27.

Schnekenburger M, Talaska G, Puga A. 2007. Chromium cross-links histone deacetylase 1-DNA methyltransferase 1 complexes to chromatin, inhibiting histone-remodeling marks critical for transcriptional activation. Mol Cell Biol. 27(20):7089-101

Sienra E., Armienta M.A., Gonsebatt M.E. 2003. Potassium dichromate increases the micronucleus frequency in the crayfish Procambarus clarkia. Environ Pollut. 126:367–70.

Singh J, McLean JA, Pritchard DE, Montaser A, Patierno SR. 1998. Sensitive Quantitation of Chromium–DNA Adducts by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry with a Direct Injection High-Efficiency Nebulizer Toxicol Sci. 46(2):260-5.

Subramanian S, Rajendiran G, Sekhar P, Gowri C, Govindarajulu P, Aruldhas MM. 2006. Reproductive toxicity of chromium in adult bonnet monkeys (*Macaca radiata* Geoffrey). Reversible oxidative stress in the semen Toxicol Appl Pharmacol. 215(3):237-49.

Ueno S, Kashimoto T, Susa N, Furukawa Y, Ishii M, Yokoi K, et al. 2001. Detection of Dichromate (VI)-Induced DNA Strand Breaks and Formation of Paramagnetic Chromium in Multiple Mouse Organs. Toxicol Appl Pharmacol. 170(1):56-62

Wang S, Leonard SS, Ye J, Ding M, Shi X. 2000. The role of hydroxyl radical as a messenger in Cr(VI)-induced p53 activation. Am J Physiol Cell Physiol. 279(3):C868-75.

Wang XF, Xing ML, Shen Y, Zhu X, Xu LH. 2006. Oral administration of Cr(VI) induced oxidative stress, DNA damage and apoptotic cell death in mice. Toxicology. 228(1):16-23

Wei YD, Tepperman K, Huang MY, Sartor MA, Puga A. 2004. Chromium inhibits transcription from polycyclic aromatic hydrocarbon-inducible promoters by blocking the release of histone deacetylase and preventing the binding of p300 to chromatin. J Biol Chem. 279(6):4110-9

Wise SS, Holmes AL, Wise JP Sr. 2006. Particulate and soluble hexavalent chromium are cytotoxic and genotoxic to human lung epithelial cells. Mutat Res. 610(1-2):2–7

Xie H, Wise SS, Holmes AL, Xu B, Wakeman TP, Pelsue SC, Singh NP, Wise JP 2005. Sr.Carcinogenic lead chromate induces DNA double-strand breaks in human lung cells. Mutat Res. 586(2):60-72.